

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類6 C12N 15/24, A61K 48/00	A1	(11) 国際公開番号 WO99/67388 (43) 国際公開日 1999年12月29日(29.12.99)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/03315 (22) 国際出願日 1999年6月22日(22.06.99) (30) 優先権データ 特願平10/177188 1998年6月24日(24.06.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 久光製薬株式会社 (HISAMITSU PHARMACEUTICAL CO., INC.)[JP/JP] 〒841-0017 佐賀県鳥栖市田代大官町408番地 Saga, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてののみ) 有馬英俊(ARIMA, Hidetoshi)[JP/JP] 〒192-0361 東京都八王子市越野6-12-102 Tokyo, (JP) 土屋晴嗣(TSUCHIYA, Seishi)[JP/JP] 〒191-0052 東京都日野市東豊田1-29-12 Tokyo, (JP) 平田隆洋(HIRATA, Takahiro)[JP/JP] 秋山勝彦(AKIYAMA, Katsuhiko)[JP/JP] 後藤 武(GOTO, Takeshi)[JP/JP] 〒305-0856 茨城県つくば市観音台1丁目25番11号 久光製薬株式会社 筑波研究所内 Ibaraki, (JP)		(74) 代理人 村山みどり, 外(MURAYAMA, Midori et al.) 〒150-0013 東京都渋谷区恵比寿4丁目20番2号 恵比寿ガーデンテラス式番館709 Tokyo, (JP) (81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDE INHIBITING THE EXPRESSION OF IL-10 PROTEIN (54) 発明の名称 IL-10蛋白の発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド (57) Abstract An antisense oligonucleotide having a specific sequence which is characterized by being hybridizable with chromosomal DNA and/or mRNA encoding IL-10 protein and thus inhibiting the expression of the IL-10 protein; and remedies for atopic dermatitis, allergic dermatitis, SLE, EB viral infection or lymphoma which contain as the active ingredient the above-mentioned antisense oligonucleotide.		

(57)要約

一定の配列を有し、IL-10蛋白をコードする染色体DNAおよび／または mRNAと特異的にハイブリダイズし、IL-10蛋白の発現を阻害することを特徴とするアンチセンスオリゴヌクレオチドが開示されている。また、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドを有効成分として含有するアトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚疾患、SLE、EBウイルス感染症またはリンパ腫用治療薬が開示されている。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサウ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

I L - 1 0 蛋白の発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド

5 技術分野

本発明は、I L - 1 0 (ヒトインターロイキン-10) 蛋白をコードする染色体DNAおよび／またはmRNAと特異的にハイブリダイズして、I L - 1 0 蛋白の発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチドと、それを有効成分として含有するアトピー性皮膚炎等の疾患の治療薬に関する。

10

背景技術

アトピー性皮膚炎は、増悪、寛解を繰り返す、掻痒のある湿疹を主病変とする疾患である。その罹病率は、全人口の3～10%を占めると考えられている(上田宏: 皮膚科MOOKアトピー性皮膚炎、金原出版、12-18、1985)。

- 15 アトピー性皮膚炎の発症メカニズムは未だ明らかにされていないが、少なくともI g Eを介したアレルギー反応のみではなく、皮膚の易刺激性という因子もその病態形成に大きく関与すると言われている。

- アトピー性皮膚炎の病巣部では、肥満細胞や好酸球の脱顆粒、C D 4 陽性T細胞を主とした細胞浸潤が認められる。皮膚に侵入したアレルゲンは、肥満細胞上のI g Eを架橋し、化学伝達物質やサイトカインを遊離させ、血管透過性の亢進や白血球の遊走を促す。また、アレルゲンは、ランゲルハンス細胞などに捕捉され、T細胞に抗原提示される。活性化されたT細胞は、様々なサイトカインを産生し炎症を助長している(C o o p e r, K. D., J. I n v e s t. D e r m a t o l., 102, 128, 1994)。

- 25 アトピー性皮膚炎に対する治療は、ステロイド薬によるものと非ステロイド薬によるものがあり、ステロイド薬は薬物治療の中心となっている。治療は長期

に渡ることが多く、薬物の副作用が大きな問題となっている。ステロイド薬を経口投与した場合、全身性の副作用である副腎機能抑制、骨髄抑制、日和見感染症等に注意する必要がある。また、外用ステロイド薬の副作用としては、毛細血管拡張、ステロイド潮紅、皮膚萎縮等のいわゆるステロイド皮膚や、カンジダ、白癬などの皮膚真菌症、癰（よう）等の化膿性皮膚炎、単純性疱疹等のウイルス性疾患などの皮膚感染症が誘発、増悪することがある。また、投与の漸減もリバウンドに注意して慎重に行う必要がある。このような副作用の問題から、現在の治療法に代わる新しい治療法の開発が強く望まれている。

一方、アトピー性皮膚炎の詳細な発症メカニズムが近年の研究により明らかになりつつある。Ohmenらは、アトピー性皮膚炎患者の炎症組織において、サイトカインであるインターロイキン-10（IL-10）蛋白が過剰発現しており、これがアトピー性皮膚炎の発症に関与すること、アトピー性皮膚炎においては単球、マクロファージ系の細胞よりIL-10蛋白が分泌されていること、及びIL-10蛋白の過剰発現を抑制することができればアトピー性皮膚炎の治療が可能であることを報告している（J. D. Ohmen, et al., J. Immunol., 154, 1956, 1995）。

IL-10蛋白は、1989年にFiorentinoらにより、Th2細胞から産生され、Th1細胞からのサイトカイン産生を抑制する因子として同定されたサイトカインであり（Fiorentino D., et al., J. Exp. Med., 170, 2081, 1989）、その後、マウスではTh2細胞、CD5陽性B細胞、マクロファージ、ケラチノサイト、肥満細胞より産生され、ヒトではTh0細胞、Th2細胞、活性化T細胞、単球、マクロファージ、活性化B細胞等、多種の細胞より産生されることが明らかにされた（Ishida H., Jpn. J. Clin. Pathol., 42, 843, 1994）。

上記のようにアトピー性皮膚炎の発症メカニズムの解析が進行したことに伴い、これらの解析結果を疾患治療に応用しようとする試みもなされるようになってき

た。その内容は、疾患の原因と考えられる I L - 1 0 蛋白産生の抑制、あるいは I L - 1 0 蛋白の機能を阻害して病状の改善を行おうとするものであり、例えば、抗 I L - 1 0 蛋白中和抗体での治療の検討がなされている (I s h i d a H., e t a l, J. E x p. M e d., 1 7 9, 3 0 5, 1 9 9 4)。

- 5 また、WO 9 7 / 3 1 5 3 2 には、A I D S 関連 B 細胞リンパ腫や慢性リンパ性白血病の治療を目的とした I L - 1 0 アンチセンス技術が開示されているが、ヒトの I L - 1 0 蛋白の mRNA 配列の内、3 1 5 - 3 4 2 に対するアンチセンスが、上記患者の B 細胞から過剰に産生される I L - 1 0 蛋白のオートクライン作用に対して抑制効果があることを開示しているのみであり、その他の配列に対しては全く記載されていない。
- 10

以上のような状況の下、アトピー性皮膚炎に対し効果があり、しかも副作用が少ない医薬品が望まれており、特にアトピー性皮膚炎は単球またはマクロファージから過剰に産生される I L - 1 0 蛋白が病因と考えられることから、アトピー性皮膚炎治療に対する新規な抗 I L - 1 0 製剤の開発が望まれている。

- 15 したがって、本発明の目的は、I L - 1 0 蛋白の産生を抑制し、I L - 1 0 蛋白を病因とする疾患、例えばアトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚疾患、全身性エリトマトーデス (S L E)、エプスタインバー (E B) ウイルス感染症、リンパ腫等を治療し得るアンチセンスオリゴヌクレオチドと、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその誘導体を有効成分として含有する治療薬を提供することにある。
- 20

発明の開示

本発明者らは、単球またはマクロファージから産生される I L - 1 0 蛋白が原因となる難治性の疾患に対して有効な治療薬を探索した結果、単球またはマクロ

25 ファージからの I L - 1 0 蛋白の産生を強く抑制するアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を発見し、本発明を完成させた。

なお、このアンチセンスオリゴヌクレオチド配列は、前述のWO 97/31532に開示されているmRNA配列の315-342に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドとは全く異なる配列である。

すなわち、本発明は、ヒトインターロイキン-10 (IL-10) 蛋白をコードする染色体DNAおよび/またはmRNAと特異的にハイブリダイズし、IL-10蛋白の発現を阻害する、下記(A)～(G)の配列のいずれか1以上を含むことを特徴とするアンチセンスオリゴヌクレオチド

(A) 配列番号1に記載の配列

(B) 配列番号2に記載の配列

10 (C) 配列番号3に記載の配列

(D) 配列番号4に記載の配列

(E) 配列番号5に記載の配列

(F) 配列番号6に記載の配列

(G) 配列番号7に記載の配列

15 と、そのアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその誘導体を有効成分として含有するアトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚疾患、SLE、EBウイルス感染症またはリンパ腫の治療薬である。

以下、本発明について詳しく説明する。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列表に示す配列番号1～7の
20 配列のうち1または2以上の配列を含むものである。

配列番号1に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの176～193の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

配列番号2に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの181～198の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

25 配列番号3に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの367～384の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

配列番号4に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの637～654の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

配列番号5に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの915～932の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

- 5 配列番号6に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの1246～1263の塩基配列に対して相補的な塩基配列であり、

配列番号7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトIL-10 mRNAの1249～1266の塩基配列に対して相補的な塩基配列である。

- 10 本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、配列番号1～7の塩基配列の1のみを含むものであっても、2以上を組み合わせる含むものであってもよい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、マクロファージにダメージを与えることがなく、マクロファージが産生するIL-10の発現を効果的に抑制するが、この抑制効果は、本発明の配列番号1から7の中でも、配列番号1、3、4、5及び6が優れており、配列番号3及び4が特に優れている。

- 15 なお、配列番号1～7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、5'側および/または3'側の塩基を1個または2個以上短くしたアンチセンスオリゴヌクレオチドであっても、IL-10蛋白の産生を抑制する活性は消失しないが、ヒトIL-10 mRNAに対する特異性を維持し、他の遺伝子に影響を与えないようにするためには、配列番号1～7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチド
20 を最小単位として使用することが好ましい。

- また、配列番号1～7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの5'側および/または3'側の塩基を1個または2個以上長くしたアンチセンスオリゴヌクレオチドであっても、IL-10蛋白の産生を抑制する活性は消失しないが、アンチセンスオリゴヌクレオチドを化学的に合成する際に、ヌクレオチドの鎖長が
25 長くなるほど合成コストが高くなることから、配列番号1～7に記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドの鎖長で使用することが好ましい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの合成方法としては、特に限定されず、通常のオリゴヌクレオチド合成機を用いたホスホロアミダイト法、ホスホロチオエート法、ホスホトリエステル法等を用いることができる。

また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの安定性や細胞に対する親和性を高めるために、その活性を著しく低下させない範囲で、リン酸エステル基またはリボース部分の水酸基を他の安定な基に置換した誘導体として用いることも可能である。このようなアンチセンスオリゴヌクレオチドの誘導体の具体例としては、リン酸エステル基をチオリン酸エステル基やメチルホスホネート基等で置換したもの、リボース部分の水酸基をメトキシやアリロキシ等のアルコキシ基、
10 アミノ基、またはフッ素原子等で置換したもの等が挙げられるが、これらの中でも、リン酸エステル基をチオリン酸エステル基に置換したものが I L - 1 0 蛋白産生抑制効果の点から好ましい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA型あるいはRNA型のいずれであっても I L - 1 0 蛋白産生抑制効果が期待できるが、生体に投与した際
15 の安定性がより高いという理由でDNA型の方が好ましい。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒト I L - 1 0 蛋白をコードする mRNA に対して相補的且つ特異的な配列を有し、mRNA または DNA の機能、すなわち、蛋白質への翻訳、細胞質内への輸送、またはその総体的生物学的機能に必要な他の活性のうちのいずれかを阻害することが可能である。さらに、
20 ステロイド剤使用の際に見られるような重篤な副作用がなく、安全かつ効果的に治療を行うことが可能である。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、単球またはマクロファージの I L - 1 0 の発現を抑制するものであるため、単球やマクロファージの I L - 1 0 蛋白過剰発現が原因の一つと考えられている疾患、例えば、アトピー性皮膚炎、
25 アレルギー性皮膚疾患、S L E、E B ウイルス感染症、リンパ腫等を有効に治療することができる。

発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、単独でも投与可能であるが、薬学的に許容され得る物質と混合し、製剤として投与することも可能である。

例えば、注射剤とする場合には、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを水、生理食塩水またはブドウ糖溶液等に溶解させて調製することができ、必要に応じて緩衝剤、保存剤あるいは安定化剤等を含有させてもよい。

軟膏剤とする場合には、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、油脂性、乳剤性または水溶性基剤に溶解または分散させて調製することができ、必要に応じて安定化剤、pH調節剤、可塑剤、乳化剤、界面活性剤、可溶化剤、湿潤剤、保存剤、防腐剤、溶剤または吸収促進剤等を含有させてもよい。

10 クリーム剤とする場合には、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、水相中に溶解または分散させ、炭化水素や高級アルコール等の油相成分と乳化することにより調製することができ、必要に応じて安定化剤、pH調節剤、可塑剤、乳化剤、界面活性剤、可溶化剤、湿潤剤、保存剤、防腐剤、溶剤または吸収促進剤等を含有させてもよい。

15 ローション剤またはリニメント剤とする場合には、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、溶剤中に溶解または分散させて調製することができ、必要に応じて安定化剤、pH調節剤、乳化剤、懸濁化剤、界面活性剤、可溶化剤、湿潤剤、保存剤、防腐剤または吸収促進剤等を含有させてもよい。

さらに、経皮または経粘膜に適用するイオントフォーシス製剤とする場合には、
20 は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドをデバイス中の導電性ゲルや薬物貯留槽等に含有させて調製することができ、必要に応じて安定化剤、pH調節剤、界面活性剤、可溶化剤、湿潤剤、保存剤、防腐剤または吸収促進剤等を含有させてもよい。

なお、これらの製剤は、薬理学的に許容できる治療上有用な他の成分を含有するものであってもよい。

25

また、さらに効率的な投与方法を望む場合には、薬学的に許容される担体と組

み合わせた形で投与することも可能である。

担体としては、例えば、リポソーム、脂肪乳剤、ミセル、等の脂質を主成分とする担体、ポリリジンやポリオルニチン等のペプチド性担体、ポリエチレンジイミン、ポリ乳酸／グリコール酸共重合体等の合成高分子担体等が挙げられるが、これらの中でも、カチオン性の電荷を有する担体が好ましい。また、細胞への取り込みの促進や標的とする細胞への指向性を高める目的で上記担体を修飾したものも使用可能である。

また、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド配列を発現させるようにデザインされたプラスミドやウイルスベクターは遺伝子治療用のベクターとして有用である。

本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはアンチセンスオリゴヌクレオチドと担体との混和物は、経口投与、静脈内投与、経皮的投与、局所投与、腹腔内投与等、投与経路に制限はないが、各疾患に対して有効性がより高い投与方法を選択することが好ましい。例えば、アトピー性皮膚炎に対する治療の際には、経皮的な投与、例えば、イオントフォoresisによる投与、クリーム剤や軟膏等の外用剤としての投与が好ましい。また、SLEに対しては静脈内投与が好ましい。投与量は、各疾患の症状の度合いや投与経路に応じて増減させることが好ましいが、目安として、静脈内投与では体重当たり1mg/kgから1g/kg、好ましくは5mg/kgから500mg/kg、より好ましくは10mg/kgから300mg/kgである。

図面の簡単な説明

図1は、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドのIL-10蛋白の発現抑制効果を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明の理解を助けるためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例において、配列番号9は、ヒトIL-10蛋白のcDNA塩基配列 (DNA Data Bank of Japan: DDBJ, Accession No. M57627) を示す。

また、配列番号1～7はヒトIL-10遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖であり、配列番号1は配列番号9の+176～+193に、配列番号2は配列番号9の+181～+198に、配列番号3は配列番号9の+367～+384に、配列番号4は配列番号9の+637～+654に、配列番号5は配列番号9の+915～+932に、配列番号6は配列番号9の+1246～+1263に、配列番号7は配列番号9の+1249～+1266に、それぞれ対応する。

さらに、配列番号8はマウスIL-10蛋白遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチド鎖の配列であり、配列番号9の+1370から+1387の中で、6つのミスマッチ配列を持つ陰性対照群である (比較例1)。

また、実施例に用いたアンチセンスオリゴヌクレオチドはいずれもホスホロチオエート型であり、ファルマシアバイオテク社により受託合成したものをを用いた。
(実施例1)

アンチセンスオリゴヌクレオチドの合成及び精製

配列表の配列番号1～8のアンチセンスオリゴヌクレオチドを、DNA合成機Oligo Pilot II (ファルマシアバイオテク社製) を用いて合成した。ホスホロチオエート法に基づき合成し、FPLC director system (ファルマシアバイオテク社製) を用い、イオン交換FPLC法に基づき精製した。

(試験例1: ヒトIL-10蛋白発現抑制効果試験)

(A) 培養細胞へのアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入

配列番号1～8のアンチセンスオリゴヌクレオチドのヒトIL-10蛋白発現抑制効果を、培養細胞系において検討した。

細胞には、ヒト単球マクロファージ系のU937細胞（大日本製薬製）を、37℃、5%CO₂の条件下で、10%牛胎児血清（FCS：三光純薬製）及び抗生物質（100 unit/mlのペニシリン（GIBCO社製）と100 μg/mlのストレプトマイシン（GIBCO社製））を添加したRPMI-1640培地（株式会社日研生物医学研究所製）（以下、FCS含有培地と言う）中で維持した。このU937細胞を96ウェルプレートに1×10⁵個/ウェルとなるように播種した後、ホルボールミリスレートアセテート（PMA：和光純薬製）を10 ng/mlとなるように添加し、12時間培養した（分化誘導）。培養終了後、細胞をリン酸緩衝溶液（PBS）で洗浄し、FCS含有培地でさらに48時間培養した後（休薬期間）、細胞をPBSで洗浄し、各アンチセンスオリゴヌクレオチドを20 μMとなるように添加し、4時間培養した。培養終了後、リポ多糖（LPS：和光純薬社製）FCS含有培地溶液（LPS最終濃度100 μg/ml）を添加し、さらに24時間培養を続けた。

（B）IL-10蛋白のELISAによる検出

次いで、上記（A）において得られた培養液から採取した培養上清中のヒトIL-10蛋白を、ELISAにより定量した。

50 μlの抗IL-10モノクローナル抗体（1 μg/ml 0.1M Na₂HPO₄溶液、pH 9：Pharmingen社製）を、96穴プレート（sumitomoH-type）に添加し、4℃にて終夜放置した後、200 μlのPBST（0.05%（V/V）Tween-20を含むPBS）で4回洗浄した。非特異的吸着を防ぐために、Blocking buffer（1%BSAを含むPBS）を各wellに200 μlずつ添加し、室温にて30分放置した後、200 μlのPBSTで3回洗浄した。次に、100 μlのBlocking buffer/Tween（0.05%（V/V）Tween-20を含むBloc

king buffer) で希釈した上記 (A) の培養液から採取した培養上清及び IL-10 蛋白スタンダードを well に添加し、室温にて 4 時間放置した後、200 μ l の PBST で 4 回洗浄した。Blocking buffer/Tween 溶液により 0.5 μ g/ml に調整したビオチン標識抗 IL-10 モノクローナル抗体 (Pharmingen 社製) を well に 100 μ l 添加し、室温にて 1 時間放置した後、200 μ l の PBST で 6 回洗浄した。さらに、Blocking buffer/Tween 溶液で 0.5 μ g/ml に調整したアビジン-パーオキシダーゼ (Pharmingen 社製) を well に 100 μ l 添加し、室温にて 30 分放置した後、200 μ l の PBST で 8 回洗浄した。50 μ l の TMB (3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン) substrate (GIBCO 社製) を well に添加し、室温にて 30 分放置した後、反応停止剤として、50 μ l の 1M リン酸を添加し、450 nm での吸光度を測定した。結果を図 1 に示す。

図 1 から明らかなように、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチド (配列番号 1~7) の IL-10 蛋白の発現抑制効果は、非添加群や比較例 1 に比べて、非常に大きいことが判明した。なお、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドの中では、配列番号 3 > 配列番号 4 > 配列番号 6 > 配列番号 1 > 配列番号 5 > 配列番号 2 > 配列番号 7 の順で、IL-10 蛋白の発現抑制効果が大きいことが判明した。

20 なお、顕微鏡による観察では細胞毒性は認められなかった。

産業上の利用可能性

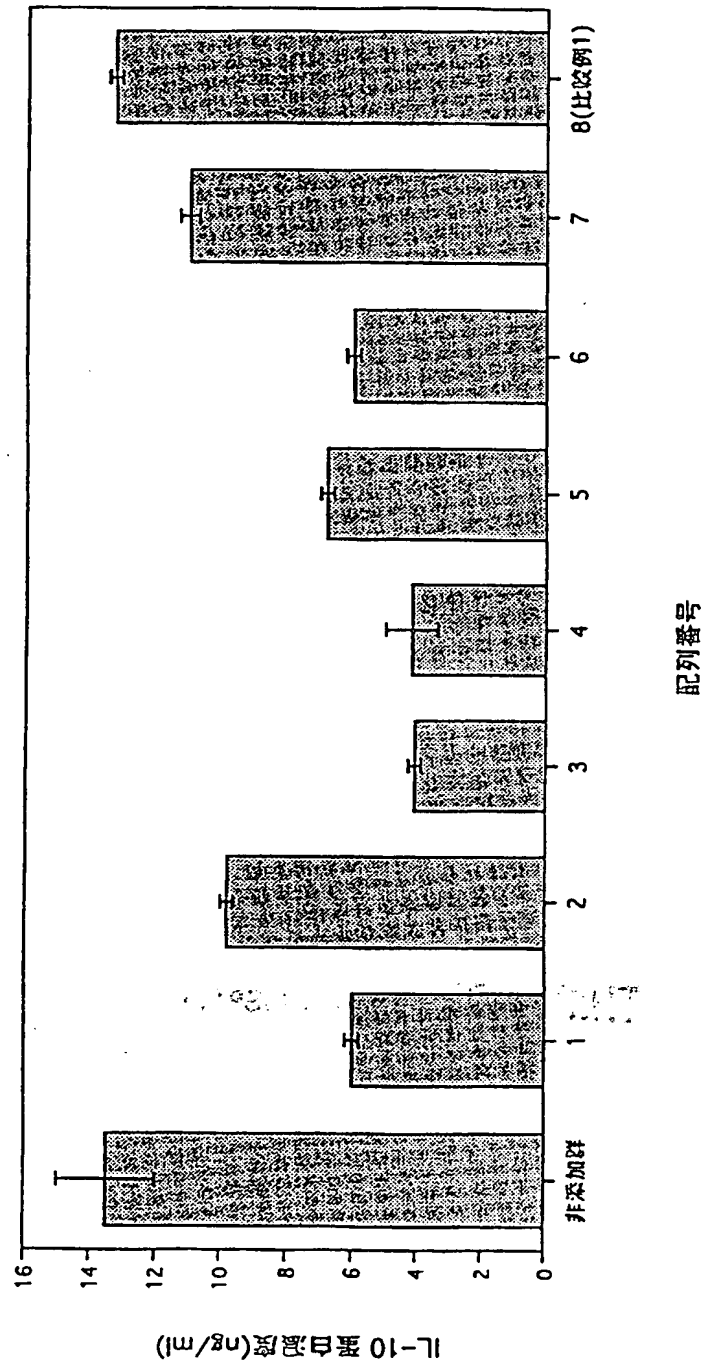
以上説明した通り、本発明のアンチセンスオリゴヌクレオチドは、IL-10 蛋白の発現を有効に抑制することができるため、IL-10 蛋白が原因となる難治性の疾患、例えばアトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚疾患、SLE、EBウイルス感染症、リンパ腫等に対して有効である。

請 求 の 範 囲

1. ヒトインターロイキン-10 (IL-10) 蛋白をコードする染色体DNA
および/またはmRNAと特異的にハイブリダイズし、IL-10蛋白の発現を
5 阻害する、下記(A)～(G)のいずれか1以上の配列を含むことを特徴とする
アンチセンスオリゴヌクレオチド。
- (A) 配列番号1に記載の配列
(B) 配列番号2に記載の配列
(C) 配列番号3に記載の配列
10 (D) 配列番号4に記載の配列
(E) 配列番号5に記載の配列
(F) 配列番号6に記載の配列
(G) 配列番号7に記載の配列
2. 請求の範囲第1項記載のアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはその誘導体
15 を有効成分として含有するアトピー性皮膚炎、アレルギー性皮膚疾患、全身性エ
リテマトーデス、エプスタインバーウイルス感染症またはリンパ腫の治療剤。

1 / 1

図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

(配列表)

配列番号 : 1

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

5 鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

アンチセンス : YES

配列の特徴 : 配列番号 9 の+176 から+193 に対応

10 配列

AGAAAGTCTTCACTCTGC

配列番号 : 2

配列の長さ : 18

15 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

アンチセンス : YES

20 配列の特徴 : 配列番号 9 の+181 から+198 に対応

配列

TTGAAAGAAAGTCTTCAC

配列番号 : 3

25 配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

THIS PAGE BLANK (USPTO)

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

アンチセンス：YES

- 5 配列の特徴：配列番号 9 の+367 から+384 に対応

配列

GGTCTTCAGGTTCTCCCC

配列番号：4

- 10 配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

- 15 アンチセンス：YES

配列の特徴：配列番号 9 の+637 から+654 に対応

配列

CTGGGTCAGCTATCCCAG

- 20 配列番号：5

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

- 25 配列の種類：他の核酸 合成 DNA

アンチセンス：YES

THIS PAGE BLANK (USPTO)

配列の特徴：配列番号 9 の+915 から+932 に対応

配列

GCTTGGAATGGAAGCTTC

5 配列番号：6

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

10 配列の種類：他の核酸 合成 DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴：配列番号 9 の+1246 から+1263 に対応

配列

GGCTGGTTAGGAACTCCT

15

配列番号：7

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

20 トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成 DNA

アンチセンス：YES

配列の特徴：配列番号 9 の+1249 から+1266 に対応

配列

25 CCAGGCTGGTTAGGAACT

THIS PAGE BLANK (USPTO)

配列番号 : 8

配列の長さ : 18

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

5 トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成 DNA

アンチセンス : YES

配列の特徴 : マウス IL-10 蛋白遺伝子

配列

10 AGGTCCTGGAGTCCAGCA

配列番号 : 9

配列の長さ : 1601

配列の型 : 核酸

15 鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA

アンチセンス : No

配列の特徴 : ヒト IL-10 蛋白の cDNA

20 配列

AAACCACAAG ACAGACTTGC AAAAGAAGGC ATGCACAGCT CAGCACTGCT CTGTTGCCTG 60

GTCCTCCTGA CTGGGGTGAG GGCCAGCCCA GGCCAGGGCA CCCAGTCTGA GAACAGCTGC 120

ACCCACTTCC CAGGCAACCT GCCTAACATG CTTCGAGATC TCCGAGATGC CTTCAGCAGA 180

GTGAAGACTT TCTTTCAAAT GAAGGATCAG CTGGACAACT TGTGTGTTAAA GGAGTCCTTG 240

25 CTGGAGGACT TTAAGGGTTA CCTGGGTTGC CAAGCCTTGT CTGAGATGAT CCAGTTTTAC 300

CTGGAGGAGG TGATGCCCCA AGCTGAGAAC CAAGACCCAG ACATCAAGGC GCATGTGAAC 360

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TCCCTGGGGG AGAACCTGAA GACCCTCAGG CTGAGGCTAC GGCCTGTCA TCGATTTCTT 420
CCCTGTGAAA ACAAGAGCAA GGCCGTGGAG CAGGTGAAGA ATGCCTTTAA TAAGCTCCAA 480
GAGAAAGGCA TCTACAAAGC CATGAGTGAG TTTGACATCT TCATCAACTA CATAGAAGCC 540
TACATGACAA TGAAGATACG AACTGAGAC ATCAGGGTGG CGACTCTATA GACTCTAGGA 600
5 CATAAATTAG AGGTCTCCAA AATCGGATCT GGGGCTCTGG GATAGCTGAC CCAGCCCCTT 660
GAGAAACCTT ATTGTACCTC TCTTATAGAA TATTTATTAC CTCTGATACC TCAACCCCCA 720
TTTCTATTTA TTTACTGAGC TTCTCTGTGA ACGATTTAGA AAGAAGCCCCA ATATTATAAT 780
TTTTTTCAAT ATTTATTATT TTCACCTGTT TTTAAGCTGT TTCCATAGGG TGACACACTA 840
TGGTATTTGA GTGTTTAAAG ATAAATTATA AGTTACATAA GGGAGGAAAA AAAATGTTCT 900
10 TTGGGGAGCC AACAGAAGCT TCCATTCCAA GCCTGACCAC GCTTCTAGC TGTGAGCTG 960
TTTTCCCTGA CCTCCCTCTA ATTTATCTTG TCTCTGGGCT TGGGGCTTCC TAACTGCTAC 1020
AAATACTCTT AGGAAGAGAA ACCAGGGAGC CCCTTTGATG ATTAATTCAC CTTCCAGTGT 1080
CTCGGAGGGA TTCCCCTAAC CTCATTCCCC AACCATTCA TTCTTGAAAG CTGTGGCCAG 1140
CTTGTTATTT ATAACAACCT AAATTTGGTT CTAGGCCGGG CGCGGTGGCT CACGCCTGTA 1200
15 ATCCCAGCAC TTTGGGAGGC TGAGGCGGGT GGATCACTTG AGGTCAGGAG TTCCTAACCA 1260
GCCTGGTCAA CATGGTGAAA CCCCCTCTCT ACTAAAAATA CAAAAATTAG CCGGGCATGG 1320
TGGCGCGCAC CTGTAATCCC AGCTACTTGG GAGGCTGAGG CAAGAGAATT GCTTGAACCC 1380
AGGAGATGGA AGTTGCAGTG AGCTGATATC ATGCCCTGT ACTCCAGCCT GGGTGACAGA 1440
GCAAGACTCT GTCTCAAAAA AATAAAAATA AAAATAAATT TGGTTCTAAT AGAACTCAGT 1500
20 TTAACTAGA ATTTATTCAA TTCCTCTGGG AATGTTACAT TGTTTGTCTG TCTTCATAGC 1560
AGATTTTAAT TTTGAATAAA TAAATGTATC TTATTCACAT C 1601

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/03315

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁶ C12N15/24, A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/24, A61K48/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	HIDETOSHI ARIMA et al., "Specific Inhibition of Interleukin-10 Production in Murine Macrophage-like Cells by Phosphoro-thioate Antisense Oligonucleotides", ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT (1998, Aug) Vol. 8, No. 4, p.319-327	1-2

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
24 August, 1999 (24. 08. 99)

Date of mailing of the international search report
31 August, 1999 (31. 08. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl^o C12N15/24, A61K48/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl^o C12N15/24, A61K48/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN), REGISTRY (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名、及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	HIDETOSHI ARIMA et al, "Specific Inhibition of Interleukin-10 Production in Murine Macrophage-like Cells by Phosphorothioate Antisense Oligonucleotides", ANTISENSE & NUCLEIC ACID DRUG DEVELOPMENT (1998, Aug) Vol. 8, No. 4, p. 319-327	1-2

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.08.99

国際調査報告の発送日

31.08.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

印

4N

9637

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

THIS PAGE BLANK (USPTO)